云 南 植 物 研 究 2002，**24**（5）：656～658
Acta Botanica Yunnanica

根癌农杆菌转化紫草的研究*

祁建军，宋经元，雷和田，张荫磷
（中国医学科学院药用植物研究所 中国协和医科大学，北京 100094）

Study on the Genetic Transformation of *Lithospermum erythrorhizon* by *Agrobacterium tumefaciens*

QI Jian-Jun，SONG Jing-Yuan，LEI He-Tian，ZHANG Yin-Ling
（*Institute of Medicinal Plant*，*Chinese Academy of Medical Science*，*Peking Union Medical College*，Binjing 100094，China）

Abstract：Crown gall tissue culture lines of *Lithospermum erythrorhizon* were established by transformation of sterile seedlings with *Agrobacterium tumefaciens* C58. Nopaline was inspected in the crown gall and showed that the transformation was successfull. L6 line，can secret red naphthoquinone pigments that are shikonin derivatives on phytohormone-free 6，7－V medium，was selected from other lines on different basic phytohormone-free media（MS，6，7－V，WP，B5）. The content of shikonin in the crown gall was 1.18%（dry tissue）. The study showed that crown gall tissue culture of L. erythrorhizon was a new method to produce shikonin.

Key words：*Lithospermum erythrorhizon*；*Agrobacterium tumefaciens*；*Crown Gall Tissue Culture*；*Shikonin*.
关键词：紫草；根癌农杆菌；冠瘿组织培养；紫草素
中图分类号：Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700（2002）05－0656－03

紫草（*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc）是传统中药。其根部含有萘醌类化合物—紫草素及其衍生物，具有显著的抗菌、抗炎、抗癌以及促进伤口愈合等生理活性。紫草素同时也是一种名贵化妆品染料。科学家对紫草的研究兴趣是基于其资源的缺乏及紫草植物本身所具有的一些特点；如：紫草素及其衍生物的颜色特性可凭借肉眼观察，紫草素及其衍生物只在紫草的根部积累，紫草素合成的次生代谢途径受多种酶和外界条件（光照，营养等）的调节等。紫草细胞培养（Fujita 等，1983；叶和春等，1991）可以产生紫草素，而利用发根农杆菌转化的毛状根培养产生紫草素的研究一直没有停止。Koichiro Shimomura 等（1991）对紫草毛状根培养产生紫草素进行了研究，Boehm 等（2000）将发根农杆菌介导的原核生物 ubiA 基因导入紫草的毛状根，Yazaki 等（2001）研究了一种黑暗诱导蛋白 LeDI－2 对悬浮培养愈伤组织和毛状根培养产生次生代谢产物的调控方法。利用天然农杆菌产生的毛状根或冠瘿瘤培养生产有用成分具有愈伤组织培养所不具备的很多优势。本实验室利用 TiC58 菌株感染紫草获得了紫草冠瘿组织，由获得的 6 个冠瘿组织筛选出生长快又能分泌色素的 L6 红色株系，收获样品的紫草素含量达到 1.18%。目前还未见有紫草冠瘿组织培养的报道。

---

* **收稿日期** 2002－03－11，2002－06－11 **接受发表**
作者简介：祁建军（1969－）男，在职硕士，主要从事药用植物生物技术的研究。
E－mail：qjj1115@sohu. com

1 材料与方法

1.1 紫草冠瘿组织的诱导

紫草（*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc）种子由中国医学科学院药用植物研究所栽培室邓友平博士惠赠。

1/2MS 培养基上培养紫草无菌苗，在长出 3 片叶子的紫草无菌苗第二叶腋处用针刺法（张荫麟等，1995）诱导冠瘿瘤。约 15 d 后感染部位出现肿胀，待瘤长到约 0.5 cm 大时，小心切下，放在含有 500 mg/L 羧苄青霉素的 MS 培养基上除菌，共获得 6 个株系：L1，L2，L3，L4，L5，L6。除完菌的冠瘿组织在不含外源植物激素的 MS 固体培养基上继代培养（温度 25℃，黑暗）。

1.2 Ti 质粒转化的证实

采用 Otten 等（1978）的纸电泳法。取冠瘿组织及紫草无菌苗叶片各 1 g，加提取液研磨后离心（5 000 r/min，10 min），毛细管分别吸取上清液点样于 Whatman 3 mm 滤纸上，同时用 Nopalin 和 Arginine（Sigma 公司产品）的标准品作对照；结果在 254 nm 紫外灯下观察，照相。

1.3 冠瘿组织的培养及基本培养基的筛选

分别以 MS，6，7 – V，WP，B5 为基本培养基，pH 5.7，在 25℃，黑暗中培养，培养容器均为 100 mL 三角瓶内装 50 mL 固体培养基；以鲜重和干重为细胞生长指标。将收获的冠瘿组织在 60℃烘干至恒重，作为细胞干重。

1.4 冠瘿组织中紫草素含量的测定

紫草素标准品由中国科学院植物所叶和春先生惠赠。

基本培养基筛选采用目视法选出红色株系冠瘿组织；冠瘿组织中紫草素含量参考叶和春等（1991）方法，用石油醚冷浸提取干燥组织细胞中的紫草素成分，比色法（751 分光光度计）测定色素含量。

2 结果与讨论

2.1 紫草冠瘿组织的诱导及基本培养基的筛选

紫草种子常温下不能发芽。用湿（含水量 30%）的细沙石拌紫草种子在低温（4℃）储藏，约 30 d 后种子开始裂口发芽。取发芽种子自来水冲洗后常规消毒，接种到 1/2MS 培养基上诱导成无菌苗。诱导成功的冠瘿组织除菌后均在不含外源植物激素的 MS 固体培养基上培养，共诱导成功 6 个冠瘿组织株系，诱导率为 40%。

分别配制 MS，6，7 – V，WP，B5 固体培养基，pH 5.7，在上述 4 种培养基上接种 6 个株系的冠瘿组织。接种量 0.52 g/瓶，共培养 42 d。结果发现所有 6 个株系的冠瘿组织均具有相同的生长表现，MS 基本培养基最适合于紫草冠瘿组织生长，B5 基本培养基次之，6，7 – V 上生长最慢。但是各培养基上干物质积累的差异同鲜重相比较小。图 1 表示 L6 株系的冠瘿组织在 4 种培养基上的生长情况。

2.2 紫草冠瘿组织红色株系的筛选及紫草素含量的测定

用胭脂碱根癌农杆菌 C58 菌株感染紫草无菌苗，获得 6 个株系的冠瘿瘤，分别标记为 L1，L2，L3，L4，L5，L6。在无生长激素的基本培养基上均能正常生长。将所得的 6 个株系冠瘿组织分别接种在无生长素的 MS，6，7 – V，WP，B5 基本培养基上，25℃黑暗培养。培养 15 d 后，生长于 6，7 – V 培养基上的 L6 株系出现粉红色组织，32 d 变成深红色，冠瘿组织基本停止生长；生长于 4 种培养基上的 L1，L2，L3，L4，L5 株系均无明显变化。收获 L6 株系红色冠瘿组织，60℃烘干至恒重，研磨成粉状，称取 1.0 g 样品，用石油醚浸提 24 h，定容为 25 mL，稀释 10 倍后用分光光度计测定样品 520 nm 处的吸光值。回归方程：$Y = 11.2X$（X 为紫草宁衍生物的浓度，单位：mg/L；Y 为 520 nm 处的吸光值）。

测得 $Y = 0.473$，紫草宁衍生物含量（C）的计算为：

$$C = \frac{Y \times 25 \times 10}{11.2 \times 0.9 \times 1000} \times 100\%$$

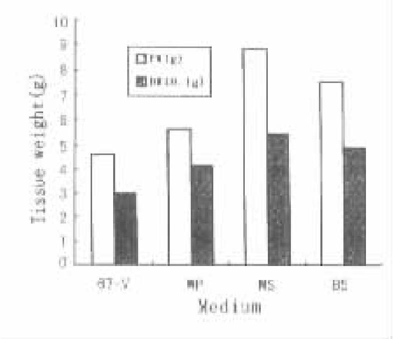

图1　不同培养基对紫草冠瘿组织生长的影响

Fig. 1　Effects of different medium on the growth of crown gall tissue culture of *L. erythrorhizon*

FW：fresh weight；DW：dry weight

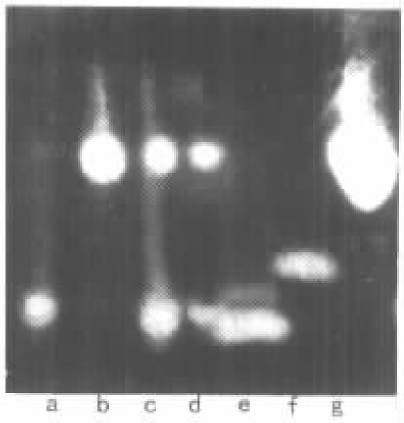

图2　冠瘿碱检测：a. L6（红色株系），b. 紫草叶片，c. L4，d. L6，e. nopaline，f. octopine，g. arginine.

Fig. 2　Opine detection of crown gall tiusse：a. L6（red line）；b. leaf of L. erythrorhizon；c. L4；d. L6；e. nopaline；f. octopime，g. arginine

2.3　紫草冠瘿组织中冠瘿碱的检测

根癌农杆菌内含有致病的Ti质粒，农杆菌感染植物受伤部位时，Ti质粒内的一特定片段（称为T-DNA）共价地整合到植物细胞核的DNA中。这一过程可用测定转化组织中的冠瘿碱或通过Sourthen杂交来证实。在T-DNA的功能基因中，有编码冠瘿碱合成酶的基因，其控制转化细胞中冠瘿碱的产生。由于转化细胞中冠瘿碱是一类特异的基因产物，所以测定冠瘿碱活性可方便鉴定植物细胞是否为T-DNA转化的证据。C58的Ti质粒为胭脂碱型，通过测定转化组织中胭脂碱从而证实转化的成功。图2表明L6，L4冠瘿组织中均检测到胭脂碱（nopaline），而无菌培养的紫草植物的叶片中未检测到〔精氨酸（arginine）为冠瘿碱合成的前体〕。

〔参考文献〕

Boehm R，Sommer S，Li SM，*et al*，2000. Genetic engineering on shikonin biosynthesis：expression of the bacterial ubiA gene in *Lithospermum erythrorhizon*［J］. *Plant Cell Physiol*，Aug：**41**（8），911—919

Fujita Y，Maeda y，Suga C，*et al*，1983. Production of Shikonon Derivatives by Cell Suspension Cultures of *L. erythrorhizon* Ⅲ. Comparision of Shikonin Derivatives of Cultured Cells and Ko-shikonin，［J］*Plant Cell Reports*，**2**：192—193

Koichiro Shimomura，Hiroshi Sudo，*et al*，1991. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*［J］. *Plant Cell Reports*，**10**：282—285

Otten LABM，Schitperoort RA，1978. A rapid micro scale method for the detection of lysoping and nopaline dehydrogenas activities［J］. *Biochem Biophys Acta*，**78**，**57**：497—604

Yazaki K，Matsuoka H，Shimomura K，*et al*，2001. A novel dark-inducible protein，LeDI-2，and its involvement in root-specific secondary metabolism in Lithospermum erythrorhizon［J］. *Plant Physiol*，Apr：**125**（4）：1831—41

Ye HC（叶和春），Yin ZH（尹作鸿），Li GF（李国风），*et al*，1991. Effects of physical and chemical factors on callus growth and shikonin derivative formation in the callus cultures of *Arnebia euchroma*［J］. *Acta Botanica Sinica*（植物学报），**33**：927—931

Zhang YL（张荫麟），Song JY（宋经元），Zhao BH（祁建军），*et al*，1995. Crown gall tissue culture and production of tanshinone in *Salvia miltiorrhiza*［J］. *Chinese Journal of Biotechnology*（生物工程学报），**11**（2）：150—152